

بررسی اثر مهارکنندگی عصاره اتانولی گیاه سعد کوفی (Cyperusrotandus) بر روی

آنزیم استیل کولین استراز

غلامعلی نادری¹، رضا حاج حسینی²، مریم عباسی³، آرزو محرابیان⁴

1. دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران (مؤلف مسوول)، تلفن ثابت: 021-88963849، naderi@shahed.ac.ir

2. استادیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

3. کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

4. دکتری عمومی پزشکی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

چکیده

مقدمه: زوال عقل (Dementia) کاهش پیش‌رونده در توانایی‌های درکی و شناختی است، که ممکن است به علت بیماری یا صدمه به مغز ایجاد شود. درمان‌های مختلف دارد که شایع‌ترین آن بیماری آلزایمر است. استیل کولین (acetylcholine) یکی از واسطه‌های شیمیایی مغز است که در ثبت، نگهداری و یادآوری اطلاعات در مغز نقش کلیدی دارد. سلول‌های عصبی ترشح‌کننده این ماده در زمره‌ی نخستین سلول‌هایی هستند که از تغییرات آسیب‌شناختی بیماری آلزایمر متأثر شده و از بین می‌روند. استراتژی دارودرمانی آلزایمر طبق آنچه در علل بروز آن وجود دارد بر اساس: افزایش تأثیر استیل کولین (از طریق افزایش مقدار استیل کولین یا افزایش حساسیت گیرنده‌های آن و یا افزایش پیش‌سازهای استیل کولین)، افزایش نوروترانسمیترها و نیز محافظت سلول‌های عصبی خواهد بود. مهارکننده‌های کولین استراز داروهای اصلی درمان آلزایمر هستند. به نظر می‌رسد جلوگیری از تجزیه استیل کولین از طریق مهار آنزیم کولین استراز، میتواند در تثبیت حافظه و قدرت تفکر اهمیت زیادی داشته باشد. با توجه به نیاز به داروهایی با عوارض کمتر برای درمان بیماری آلزایمر، این مطالعه با هدف بررسی اثر مهارکنندگی عصاره گیاه سعد کوفی بر روی آنزیم استیل کولین استراز انجام گردید.

روش بررسی: فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AChE) براساس روش المن و همکاران با مقیاس $\frac{nmol}{min/mg}$ اندازه‌گیری شد و سپس با استفاده از نمودار لینوربرگ میزان K_m ، V_{max} و K_i واکنش‌ها محاسبه شد. در تمام مراحل غلظت آنزیم ثابت بود و فعالیت آن در شش غلظت استیل تیو کولین (5، 10، 15، 20، 25 و 30 میلی‌مولار) در دمای اتاق (25-27 درجه سانتیگراد) بر اساس میزان جذب نوری در طول موج 412 nm اندازه‌گیری شد؛ آزمایشات در حضور غلظت‌های مختلف فیزوستیگمین (0/5، 0/75، 1، 1/5 و 2) (mg/100ml) و همچنین در حضور غلظت‌های مختلف سعد کوفی (0/1، 0/2، 0/3، 0/4، 0/5، 0/6 و 0/7) (mg/ml) انجام گردید. همچنین براساس معادله دیکسون (Dixon plot) با اثر غلظت‌های مختلف مهارکننده‌ها و محاسبه درصد فعالیت، میزان IC_{50} مهارکننده‌ها به دست آمد.

یافته‌ها: KI سعد کوفی تقریباً 40 برابر بیشتر از KI فیزوستیگمین بود. میزان IC_{50} برای فیزوستیگمین $2/21 \mu g/ml$ و برای سعد کوفی $139 \mu g/ml$ بود

نتیجه‌گیری: بر اساس مکانیسم مهارکنندگی آنزیمی هر چه میزان KI و نیز IC_{50} کمتر باشد قدرت مهارکنندگی بیشتر است، لذا با توجه به نتایج بدست آمده فیزوستیگمین نسبت به سعد کوفی مهارکننده قوی‌تری می‌باشد. البته با خلص‌سازی ماده موثره این گیاه ممکن است تأثیر و مهارکنندگی آن بیشتر گردد. علاوه بر این سعد کوفی عوارض جانبی داروی شیمیایی فیزوستیگمین اعم از سرگیجه، تهوع و غیره را ندارد.

واژه‌های کلیدی: استیل کولین استراز، سعد کوفی، فیزوستیگمین، آلزایمر.

وصول مقاله: 93/12/12 اصلاحیه نهایی: 94/6/16 پذیرش: 94/7/19

مقدمه

دستگاه گوارش، غشاهای مخاطی و زیر جلد جذب شده و از سد خونی مغزی عبور می‌کند و نیز دارای عوارض نامطلوبی مانند انقباض عضلانی، ضعف، تهوع، استفراغ، انقباض نایژه‌ها و تحریک سیستم اعصاب مرکزی است که با توجه به این عوارض آزار دهنده نیاز به داروهایی با عوارض کمتر می‌باشد (8).

سعد، گیاهی است از خانواده جگنھا (Cyperaceae) که متجاوز از یکصد گونه دارد که بعضی از گونه‌های آن مصرف دارویی دارند (9). سعد کوفی به طور کلی افزایش دهنده هوش و حافظه، مدر، التیام‌دهنده زخم، تب‌بر و ضد- آفت می‌باشد و نیز در موارد تپش قلب، یرقان و انگل‌های روده‌ای استفاده درمانی دارد (10). با توجه به خواص درمانی ذکر شده برای این گیاه در کتب طب سنتی و نیاز به داروهایی با عوارض کمتر برای درمان بیماری‌هایی هم‌چون آلزایمر، این مطالعه با هدف بررسی اثر مهارکنندگی عصاره گیاه سعد کوفی بر روی آنزیم استیل‌کولین‌استراز انجام گردید.

روش بررسی

نوع مطالعه توصیفی - آزمایشگاهی بود. مراحل اجرا و مواد مورد نیاز:

الف - مواد: 1) آنزیم استیل‌کولین‌استراز با فعالیت ویژه 52/63 IU (2) سوپسترای استیل‌تیو کولین با غلظت‌های 5 الی 30 میلی‌مولار (3) بافر فسفات 70 میلی‌مولار با 7/4 pH=4، بافر تریس 25 میلی‌مولار با 7/4 pH=5، ماده رنگی 5و5 دی‌تیویس 2-نیتروبنزوتیک اسید 10 میلی‌مولار (DTNB) 6) فیزوستگمین و سعد کوفی با غلظت‌های مختلف بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر.

ب - اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز: فعالیت آنزیم AChE بر اساس روش المن و همکاران با مقیاس $\frac{nmol}{min/mg}$ اندازه‌گیری شد (11). برای این منظور جهت بررسی میزان جذب نور از دستگاه اسپکتوفوتومتر

زوال عقل (Dementia) عبارت است از کاهش پیشرونده در توانایی‌های درکی و شناختی که ممکن است به علت بیماری یا صدمه به مغز ایجاد شود. علائم اولیه زوال عقل شامل تغییر در شخصیت، رفتار، تأثیر بر حافظه کوتاه‌مدت، قدرت فهم و تکلمی باشد. دمانس انواع مختلفی دارد که شایعترین آن بیماری آلزایمر است (1). در این بیماری کاهش حافظه، رفتار غیر معمول، کاهش توانایی تفسیر و تغییر شخصیت دیده می‌شود (2). علل بیماری می‌تواند: 1) ژنتیک (2 سن 3) وجود آلومینیوم در محیط یا غذا باشد (3). روش‌های درمانی مشخص و قطعی برای این بیماری وجود ندارد لیکن با روش‌های مختلف می‌توان این بیماری را کنترل نمود و عوارض آن را کاهش داد. در این راستا می‌توان استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها و مهارکننده‌های استیل‌کولین‌استراز و داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی را نام برد (4).

استیل‌کولین نقش بسیار مهمی را به عنوان یک ماده هدایت‌کننده جریان عصبی در اعصاب کنترل‌کننده عضلات مخطط، صاف، عضله قلبی و غدد بازی می‌کند. استیل‌کولین‌استراسیداستیک و کولین می‌باشد (5). استرازاها در اصل گروهی از هیدرولازها می‌باشند. هیدرولازها سبب تسهیل عمل هیدرولیز اتصالات گوناگون می‌شوند (6). استیل‌کولین استراز از نظر فیزیولوژی و مکانیسم عملکرد دارای اهمیت زیادی می‌باشد و می‌تواند به عنوان شاخص برای مطالعه فرآیند سیناپتوزن و میان‌کنش عصبی-عضلانی مورد بررسی قرار گیرد. استیل‌کولین‌استراز باعث تجزیه استیل‌کولین در مواضع سیناپسی می‌گردد (7).

استفاده از مهارکننده‌های آنزیم کولین‌استراز به عنوان دارودر مواردی رخ می‌دهد که بدن با کاهش فعالیت کولینرژیک مواجه باشد و پزشک بخواهد با مهار آنزیم هیدرولیزکننده AChE میزان استیل‌کولین را در بدن افزایش دهد. از این دست داروها می‌توان فیزوستگمین را نام برد که یک مونومتیل‌کاربامات است. این دارو به آسانی از

همچنین با استفاده از فرمول زیر درصد مهار کنندگی و درصد فعالیت آنزیم را در هر واکنش محاسبه گردید:

$$\text{درصد مهار کنندگی} = \frac{\text{سرعت در حضور مهار کننده} - \text{سرعت در شایب مهار کننده}}{\text{سرعت در شایب مهار کننده}}$$

درصد مهار کنندگی - ACT% = 100

در مطالعات سینتیکی انجام شده با استفاده از نمودار لینوربرگ میزان K_m و V_{max} و K_i واکنشها محاسبه شد. همچنین براساس معادله دیکسون (Dixon plot) با اثر غلظت‌های مختلف مهار کننده‌ها و محاسبه درصد فعالیت، میزان IC_{50} مهار کننده‌ها بدست آمد.

روش تهیه عصاره اتانولی سعد کوفی

ریشه گیاه به صورت ریزوم و مغز است که تنها ریزوم مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا ریزوم جدا و آسیاب شد و سپس 100 گرم از پودر حاصل در یک بشر یک لیتری، توزین شد و مقدار 400 میلی‌لیتر اتانول 90 درصد به آن اضافه گردید. پس از مخلوط کردن محتویات داخل بشر با همزن، بشر به صورت در بسته در مکانی خشک و خنک به دور از نور آفتاب به مدت 72 ساعت نگهداری شد. در این مدت محتویات بشر به صورت روزانه مخلوط می‌گردید. در پایان محتویات بشر از کاغذ صافی (واتمن) عبور داده شد تا محلول صاف و یک دستی به دست آید. مایع حاصل در پلیت‌های شیشه‌ای که از قبل تهیه شده بود به صورت لایه ای ریخته و روی آن با پارچه توری پوشانیده شد که در نهایت منجر به تولید الکل بخار و عصاره گیاه گردید.

به منظور پیدا کردن بهترین غلظت جهت مهار آنزیم استیل-کولین استراز، سه غلظت 1mg/10ml، 1mg/100ml و 1mg/ml از عصاره سعد کوفی تهیه شد و تاثیر مهار کنندگی هر کدام از این غلظت‌ها مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که بهترین اثر مربوط به غلظت 1mg/ml با اثر حدود 95% اثر مهار کنندگی بود. بنابراین از این غلظت به عنوان استوک جهت تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره گیاه استفاده شد.

UV-Vis مدل PG Instrument) استفاده شد، بنابراین محلول‌هایی به حجم 3/1 میلی‌لیتر شامل 100 میکرولیتر ماده رنگی 5و5 دی تیویس 2نیتروبنزوتیک اسید 10 میلی مولار (DTNB)، 40 میکرولیتر استیل تیوکولین یددار به عنوان سوبسترا با غلظت‌های مختلف، 200 میکرولیتر آنزیم استیل کولین استراز با غلظت 1 میلی گرم در مولار، 60 میکرولیتر از مهار کننده‌های فیزوستگمین یا سعد کوفی و مابقی حجم لازم محلول بافر تریس در کووت‌های مختلف تهیه شد. محلول‌ها در فر به مدت 10 دقیقه تحت دمای 37-35 سانتیگراد قرار داده شدند و سپس توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج 412 نانومتر برای مدت 20 دقیقه، هر دقیقه یک‌بار جذب نوری (دانسته نوری) محلول‌ها اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم براساس نانومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتیین نشان داده شد.

بررسی سینتیکی

در تمام مراحل غلظت آنزیم ثابت بود و فعالیت آن در شش غلظت استیل تیوکولین (5، 10، 15، 20، 25 و 30 میلی مولار) در دمای اتاق (27-25 درجه سانتیگراد) بر اساس میزان جذب نوری در طول موج 412 nm اندازه‌گیری شد؛ آزمایشات در حضور غلظت‌های مختلف فیزوستگمین (0/5، 0/75، 1، 1/5 و 2) (mg/100ml) و همچنین در حضور غلظت‌های مختلف سعد کوفی (0/1، 0/2، 0/3، 0/4، 0/5، 0/6 و 0/7) (mg/ml) انجام گردید. در تمام مراحل شرایط یکسان بوده و این دو ماده به عنوان مهار کننده آنزیمی مورد استفاده قرار گرفتند. در هر یک از آزمایشات پس از محاسبه میانگین جذب (ΔA) برای هر نمونه از رابطه زیر برای محاسبه سرعت آنزیم استفاده شد:

$$\text{Rate} = \frac{\Delta A.V}{1.36 \times 10^{-2}} \times \frac{1}{C.V}$$

ΔA : اختلاف جذب؛ V: حجم کووت برابر با 3/1ml؛ Y: حجم آنزیم برابر با 0/2ml؛ C: غلظت آنزیم برابر با 1mg/ml

روش آماری

داده ها وارد محیط نرم افزار SPSS شده و با استفاده از شاخص های آمار توصیفی تحلیلی لازم انجام گردید و نتایج بصورت جدول و نمودار ارائه شد.

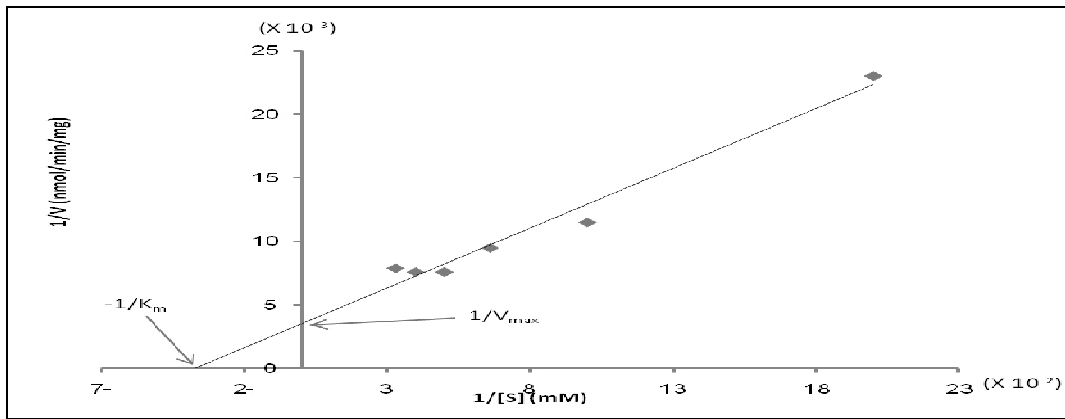
نتایج

در حالت کنترل از غلظت های 5، 10، 15، 20، 25 و 30 میلی مولار استیل تیوکولین ییددار (سوبسترا) و غلظت 1mg/ml آنزیم استیل کولین استراز استفاده شد که در نتیجه Km واکنش برابر با 30mM و V_{max} واکنش برابر با $286 \frac{nmol}{min/mg}$ بدست آمد (نمودار 1). هنگامی که از غلظت 10µg/ml فیزوستگمین در حضور غلظت های 5، 10، 15، 20، 25، 30 میلی مولار سوبسترا و غلظت 1mg/ml آنزیم استیل کولین استراز استفاده شد، مشابه حالت کنترل V_{max} واکنش برابر با $286 \frac{nmol}{min/mg}$ بود ولی Km ظاهری واکنش برابر با 90mM گردید (نمودار 2) (مهارکننده رقابتی). وقتی در همین شرایط از غلظت 400µg/ml سعد کوفی در حضور غلظت های 5، 10، 15، 20، 25، 30 میلی مولار سوبسترا و غلظت 1mg/ml آنزیم استیل کولین استراز استفاده شد V_{max} واکنش برابر با $106 \frac{nmol}{min/mg}$ گردید ولی

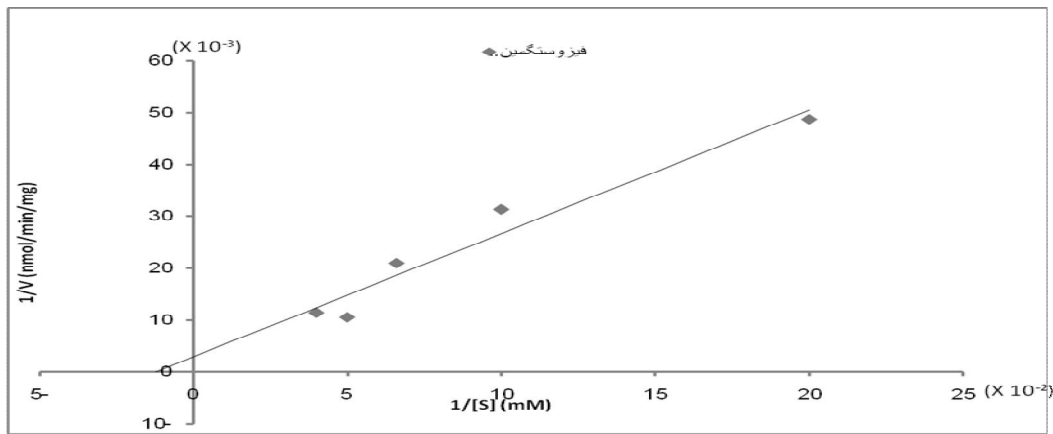
Km ظاهری واکنش برابر با 10mM به دست آمد (نمودار 3) که نشان دهنده این موضوع است که عصاره گیاه سعد کوفی تاثیر مثبت خود را بر روی آنزیم مانند فیزوستگمین از طریق مهار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز نهاده است. اما برخلاف فیزوستگمین به صورت نارقابتی موجب مهار آنزیم می شود (جدول 1). هم چنین Ki واکنش طبق فرمول Km ظاهری مهارکننده رقابتی و نمودار لاینوربرگ در غلظت 10µg/ml فیزوستگمین برابر با 5µg/ml محاسبه شد و در غلظت 400µg/ml سعد کوفی با استفاده از فرمول Km ظاهری مهارکننده نارقابتی و به کمک نمودار لاینوربرگ، Ki واکنش برابر با 200µg/ml تعیین شد. در واقع Ki سعد کوفی تقریباً 40 برابر بیشتر از Ki فیزوستگمین بود، که بر اساس مکانیسم مهارکنندگی آنزیمی هر چه Ki میزان کمتر باشد قدرت مهارکنندگی بیشتر است. بنابراین فیزوستگمین قدرت مهارکنندگی بیشتری نسبت به سعد کوفی دارد. میزان IC_{50} در نمودار 4 برای فیزوستگمین 2/21 µg/ml و در نمودار 5 برای سعد کوفی 139 µg/ml می باشد، که این خود نیز نشان دهنده قوی بودن اثر مهارکنندگی فیزوستگمین نسبت به سعد کوفی بر روی آنزیم استیل کولین استراز می باشد.

جدول 1: مقایسه نایتهای سینتیکی آنزیم استیل کولین استراز در حضور مهارکننده های فیزوستگمین و سعد کوفی

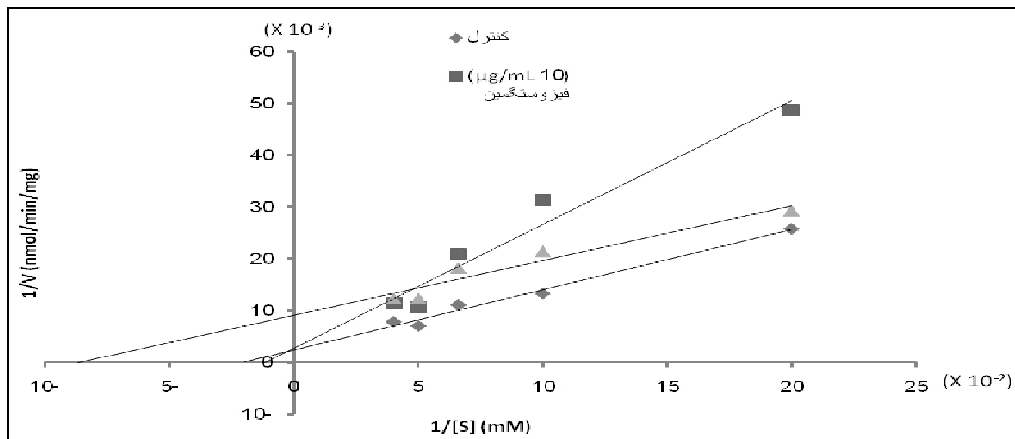
نام ترکیب	غلظت مهارکننده Ug/ml	نوع مهارکننده	IC_{50} µg/ml	Ki (µ/ml)	V_{max} ($\frac{nmol}{min/mg}$)	Km (mM)
آنزیم نرمال	0	-	0	0	286	30
فیزوستگمین	10	رقابتی	3/21	5	286	90
سعد کوفی	400	نارقابتی	139	200	106	10



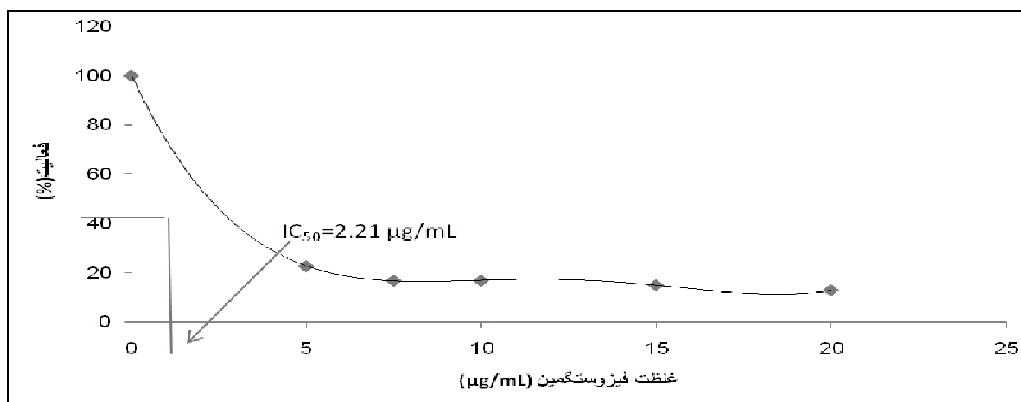
نمودار 1: منحنی لاینوربرگ 1/V در مقابل 1/ASCh آنزیم استیل کولین استراز



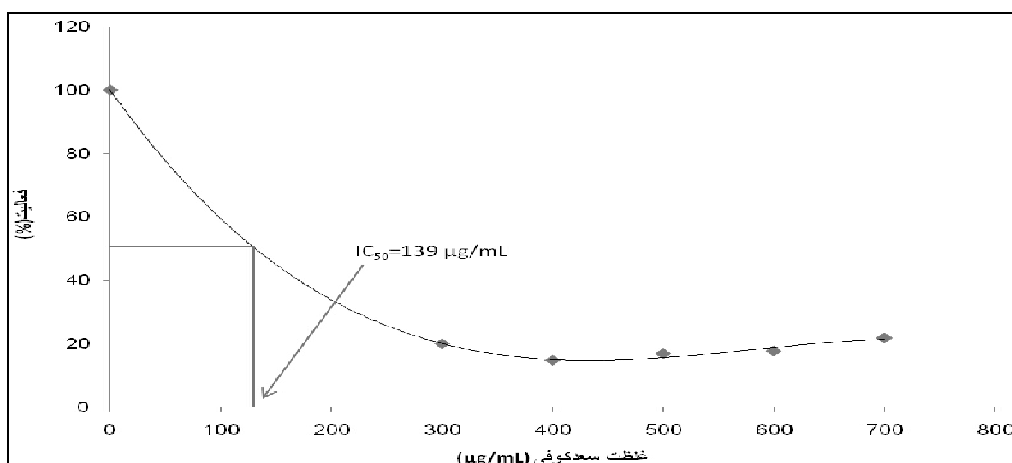
نمودار 2: منحنی لاینوربرگ 1/V در مقابل 1/ASCh در حضور غلظت 10 µg/ml مهارکننده فیروستگمین



نمودار 3: منحنی لاینوربرگ 1/V در مقابل 1/ASCh در حضور مهارکننده فیروستگمین (10 µg/ml) وعصاره گیاه سعد کوفی (400 µg/ml) وعدم حضور مهارکننده‌ها.



نمودار 4: اثر غلظت‌های مختلف مهارکننده فیزوستیگمین بر روی آنزیم استیل کولین استراز (محاسبه IC_{50} مهارکننده).



نمودار 5: اثر غلظت‌های مختلف مهارکننده عصاره سعدکوفی بر روی آنزیم استیل کولین استراز (محاسبه IC_{50} مهارکننده).

بحث

مهارکننده این آنزیم از اهمیت ویژه ای برخوردار است. یک دسته از گیاهانی که اثرات بیولوژیک فراوانی برای آنها گزارش شده است گیاهان جنس *Ferula* هستند. این گیاهان سرشار از ترکیبات سزکویی ترپن و کومارین می باشند. در همین راستا در تحقیقی هما حاجی مهدی پور و همکاران اثرات مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز برخی گونه های جنس *Ferula* را مورد بررسی قرار داده که نتایج مثبتی را در اکثر گونه های آن بدست آوردند (17). از طرفی داروهای فیزوستیگمین و گالاتامین دو ترکیب با ساختار آلکالوئیدی هستند که از گیاهان جدا شده اند و دارای اثر مهارکنندگی بر روی آنزیم استیل کولین استراز

برخی از ترکیبات شیمیایی قادرند با عوامل شیمیایی موجود در جایگاه فعال آنزیم ها یا با کوآنزیم و با یون های فعال کننده یک آنزیم اتصال برقرار نموده و به عنوان یک عامل مهارى در مقابل فعالیت کاتالیزوری آنها عمل نمایند (12 و 13). بسیاری از این ترکیبات مهارکننده آنزیم ها در قالب دارو و یا سموم برای درمان گروهی از بیماری ها مانند آلزایمر و گلوکوم مورد استفاده قرار می گیرند (14-16). از طرفی با توجه به روند افزایشی شیوع بیماری آلزایمر در بین سالمندان و مؤثر بودن داروهای مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز در بهبود بیماری، یافتن داروهای جدید

می باشند (18). همچنین عصاره برخی از گیاهان مانند سعد کوفی بر روی آنزیم استیل کولین استراز اثر مهاری داشته که می تواند در درمان بیماری آلزایمر و عدم پیشرفت آن موثر باشند. سعد کوفی دارای مواد موثره مختلف مانند ترکیبات آلکالوئید، فلاونوئید اولیگو مریک و تانین با خواص آنتی اکسیدانتی می باشد (19). کار برد بالینی و درمانی این گیاه بدلیل وجود این مواد موثره و نیز سایر ترکیبات مهم آن بعنوان اثرات ضد دیابت، ضد بیماریهای التهابی، ضد مالاریا، ضد درد، موثر در بیماریهای گوارشی و نیز ضد آلزایمر می باشد (20 و 21).

در تحقیقی R Sharman اثر مهاری سعد کوفی را بر روی آنزیم استیل کولین استراز در حیوانات و نیز گیاهان مورد بررسی و مقایسه قرار داد (22). همچنین در تحقیقی دیگر محمود عزیزی و همکاران با استفاده از مکمل غذایی حاوی عسل و زعفران و نیز سعد کوفی برای درمان بیماران آلزایمری نتایج مثبت و امیدوار کننده ای را بدست آوردند (23). همچنین در بررسی دیگر محمد رضا حجتی و همکاران با اثر ریزوم گیاه سعد کوفی و تاثیر مثبت بر روی فعالیت میانجی عصبی استیل کولین و متعاقب آن تاثیر بر روی تعادل حرکتی موش ها به نتایج مثبت و معنی داری رسیدند (19). مجموعه این تحقیقات نشان می دهد که گیاه سعد کوفی میتواند در درمان آلزایمر موثر باشد.

نتایج تحقیق ما نیز از نظر آزمایشگاهی نشان می دهد که سرعت ماکزیم برای آنزیم V_{max} بدون مهار کننده برابر $286 \frac{nmol}{min/mg}$ و در حضور فیزوستگمین نیز 286 ولی در حضور سعد کوفی کاهش یافته و برابر با 106 گردیده است، بعلاوه ثابت میکائیلیس و منتون (Km) آنزیم بدون مهار کننده برابر با 30mM و با حضور فیزوستگمین 90 و در حضور سعد کوفی 10 mM که کاهش یافته است. بر اساس این نتایج و به استناد معادلات مهم سنیتیک آنزیمی میکائیلیس-منتون ولینوربرگ داروی فیزوستگمین بر روی آنزیم استیل کولین استراز بصورت مهار کننده رقابتی و

سعد کوفی از نوع مهار کننده نارقابتی عمل می نماید. همچنین با مقایسه ثابت مهار کنندگی (KI) دو ترکیب، KI برای فیزوستگمین برابر با 5 $\mu g/ml$ و برای سعد کوفی 200 $\mu g/ml$ می باشد و از طرف دیگر مقدار IC50 برای فیزوستگمین برابر 2/21 $\mu g/ml$ و برای سعد کوفی 139 $\mu g/ml$ خواهد بود. با توجه به اینکه میزان IC50 عصاره سعد کوفی نسبت به فیزوستگمین بیشتر است، لذا از نظر فارماکولوژیک، سعد کوفی نسبت به فیزوستگمین مهار کننده نسبتا ضعیف برای آنزیم می باشد. البته با خالص سازی ماده موثره این گیاه ممکن است اثر مهار کنندگی آن بیشتری شود.

نتیجه گیری

بر اساس این نتایج اولاً: مصرف این گیاه با توجه به مهار آنزیم استیل کولین استراز موثر در درمان بیماری آلزایمر خواهد بود، ثانیاً: با وجود قدرت مهاری کمتر آن نسبت به داروی شیمیایی فیزوستگمین، انواع عوارض جانبی فیزوستگمین از جمله سرگیجه، تهوع و خواب آلودگی و... را برای انسان نخواهد داشت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله از زحمات بی شائبه آقای حسین نامی کارشناس بخش بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد و مسئولین دانشکده و همچنین از دانشگاه پیام نور استان تهران - دانشکده علوم پایه به خاطر همکاری در انجام پژوهش سپاسگزار می نمایم.

References

1. Rogin S, Ceal F, Lippe. Alzheimer disease and other dementias. A review 2002; 17:7.
2. Parihar M.S, Hemneni T. Alzheimer disease pathogenesis and therapeutic interventions. *Clinneurosci* 2004; 11: 456-67.
3. Giacobini E. Do cholinesterase inhibitors have disease - modifying effect in Alzheimer's disease?. *CNS Drugs* 2001; 15: 85-91.
4. Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *BehavNeurosci*, 1998; 112: 1199-1208.
5. Oliver, Camier. Pharmacology of the peripheral Autonomic Nervous system. Year book medical publishers, Inc., 1972; pp121-129.
6. Dixon M. Webb E. C. Enzymes, 3rd.end. Academic press Inc.USA., 1979. PP:208.301
7. Carrol R.T, Grimm J.L, Hepburn T. W and E merlingM.R.Purification of acetylcholinestrse by tacrine affinity chromatography. *Protein expression and purification*, 1995; pp389-393.
8. Oveysi Y., Pharmacology of neural system drugs, Medical publication of the year, 1370; pp54-66
9. Mirheydar H. Plant Sciences. Office of publication of Islamic culture.Tehran, 1375; pp351-357
10. Soltani A. Encyclopedia of traditional medicine. Arjomand Publisher. Tehram, 1383; pp447-448
11. Ellman G.L, Courthey K.D, Andres V, Featherstone A.M. A new and rapid colorimic determination of acetyl cholinesterase activity. *Biochempharmacol* 1961; 7:88-95
12. Carotti A, Candia M, Catto M. Ester derivatives of annulated tetrahydroazocines:A new class of selective acetylcholinesteraseinhibitors.*Bioorg Med Chem*. 2006; 14:7205-7212.
13. Choudhary M.I, Devkota K.P, Nawaz S.A, Ranjit R, Rahman A. Cholinesterase inhibitory pregnan- type steroidal alkaloids from *Sarcococcahookeriana*Stteroids. 2005; 70: 295-303.
14. Khalid A, Haq Z, Ghayur M.N, Feroz F, Rahman A, Choudhary M.I. Cholinesterase inhibitory and spasmolytic potential of steroidal alkaloids. *Steroid BiochemMol Biol*. 2004; 92: 477-489.
15. Ballaed C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones e. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011; 377: 1019-1031.
16. Massoud F, Leger G.C. Pharmacological treatment of Alzheimer disease. *Can .j.Psychiatry*. 2011;56:579-588.
17. Shekarchi, Hajimehdipoor H, Naghibi F. Investigating Acetylcholinesterase Inhibitory Effects of some *Ferula*. *Journal of Medicinal Plants*.2013;12:106-112.
18. Colombres M, Sagal J.P, Inestrosa N.C. An overview of the current and novel drugs for Alzheimer's disease with particular reference to anti-cholinesterase compounds. *Curr. Pharm. Des*. 2004; 10: 3121-3130.
19. Rabiei Z, Gholami M, Hojjati MR. The Effect of *Cyperus Rotundus* Ethanolic Extract on Motor Coordination in a Rat Model of Alzheimer. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*. 2014: 92:43-54.
20. Singh N,Pandey BR,Varma P,Bhalla M and Gilca M. Phyto-pharmacotherapeutics of *Cyperus rotundus* Linn. (Motha): An overview.*Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2012:3: 467-476.
21. Sivapalan S R. Medicinal uses and pharmacological activities of *Cyperus rotundus* Linn-A Review.*International Journal of Scientific and Research Publications*. 2013: 3: 2250-3153.
22. Sharma R., Gupta R. *Cyperus rotundus* extract inhibits acetylcholinesterase activity from animal and plants as well as inhibits germination and seedling growth in wheat and tomato. *Life Sciences*. 2007 :30;80:2389-92.
23. Jivadi N. Zare-Hassanabadi N; Azizi M. Effect of combination of honey, saffron (*Crocus sativus* L.) and sedge (*Cyperus rotundus* L.) on cognitive dysfunction in patients with Alzheimer's disease. *Advanced Herbal Medicine*. 2015;1: 11-16.